Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 2, June. July. 2020, p. 221- 233

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۶، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۹ ص. ۲۳۳-۲۲۱

تعیین ترکیبات شیمیایی، ویژگی‌های ضداکسایشی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس دانه گشنیز بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا

مرضیه امیدی میرزائی[۱]- محمد حجتی[۲*]- بهروز علیزاده بهبهانی[۳]- محمد نوشاد[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۲۲

چکیده

در طب سنتی ایران از دانه‌های گشنیز به‌طور گسترده به‌منظور درمان بیماری استفاده می‌شود. هدف از این پژوهش، شناسایی ترکیبات شیمیایی، قدرت آنتی‌اکسیدانی و بررسی فعالیت ضدمیکروبی اسانس دانه گشنیز بود. ترکیبات شیمیایی اسانس دانه گشنیز با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی شناسایی شد. فنول کل و قدرت آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب با روش‌های فولین سیوکالتو، رادیکال‌های ABTS و DPPH اندازه‌گیری گردید. قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مقایسه شد. فعالیت ضدمیکروبی اسانس دانه گشنیز با روش‌های انتشار در آگار به کمک دیسک (کربی- بوئر)، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی برای باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا* تعیین گردید. براساس نتایج آنالیزهای شیمیایی، اسانس دانه گشنیز غنی از مونوترپن‌های اکسیژن‌دار (۸۹/۹۴٪) بود. ترکیب عمده اسانس دانه گشنیز لینالول (۷۶/۷۵٪) بود. بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد برای DPPH، ۵۳/۷۵٪ و برای ABTS، ۶۶/۶۰٪ در غلظت ۹۰۰ ppm مشاهده شد. مقدار فنول کل موجود در اسانس ۳۸/۰۴ ±۰/۰۲ mg GAE/g بود. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین قطر هاله عدم رشد به‌ترتیب مربوط به باکتری *باسیلوس سرئوس* (۳۰/۳۰ میلی‌متر) و *سالمونلا تیفی* (۲۳/۱۵میلی‌متر) بود. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس دانه گشنیز برای باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوز* و *سالمونلا تیفی* به‌ترتیب برابر با ۲، ۴، ۴ و۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. به‌طورکلی نتایج نشان داد که اسانس دانه گشنیز داری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتر از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA بود.

واژه‌های کلیدی: ضدباکتریایی، دانه گشنیز، آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، آنتی‌اکسیدان سنتزی.

مقدمه

مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در برابر عوامل ضدمیکروبی و داروها، به‌عنوان یک نگرانی از سلامت عمومی در قرن ۲۱ محسوب می‌شود. بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌ها و قارچ‌ها در سرتاسر دنیا به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه رو به افزایش می‌باشد (Noshad *et al.*, 2018). در سالیان اخیر به دلیل افزایش آگاهی مردم از خطرات و عوارض جانبی استفاده از داروها و آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی و سنتزی تمایل به استفاده از گیاهان دارویی و طبیعی به‌عنوان جایگزین داروهای سنتزی رو به فزونی گذاشته است. علاقه به مصرف مواد ضدمیکروبی طبیعی و غیرسنتزی به‌عنوان یک جایگزین بالقوه برای مهارکننده‌های رشد میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت افزایش یافته است. گیاهان معطر و اجزای آن به‌عنوان مهارکننده‌های رشد میکروارگانیسم‌ها بیماری‌زا شناخته شده‌اند و بیشتر خواص آن‌ها با اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه مرتبط است. از لحاظ تاریخی، اسانس‌های مختلف به‌طور گسترده‌ای به‌دلیل قابلیت‌های بالقوه آنتی‌بیوتیکی مورد پذیرش قرار گرفته‌اند (Calo *et al.*, 2014).

اسانس‌ها در اندام‌های مختلف گیاهان معطر مانند گل‌ها، برگ‌ها، ریشه، ساقه و بذر می‌توانند تجمع پیدا کنند که حاصل متابولیسم‌های ثانویه گیاه می‌باشند. اسانس‌ها می‌توانند از گیاه در برابر باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و آفت‌ها محافظت نمایند. اسانس‌ها، منابع غنی از ترکیبات بیولوژیکی فعال هستند که در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. پژوهش‌های مختلفی اثر ضدمیکروبی، ضدقارچی، ضدویروسی و حشره‌کشی اسانس‌های گیاهی را به اثبات رسانده است (Azhdarzadeh *et al.*, 2016).

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
(*-نویسنده مسئول: Email: hojjati@asnrukh.ac.ir)

DOI: 10.22067/ifstrj.v16i2.82025

گشنیز (*Coriandrum sativum* L.) گیاهی یکساله متعلق به خانواده *Apiaceae* است که با توجه به شرایط آب و هوایی، به‌عنوان یک محصول تابستانه یا زمستانه کشت می‌شود. ارتفاع این گیاه ۲۰تا۷۰ سانتی‌متر است. مطالعات فارماکولوژیک[1] اثر ضددیابتی و ضدسرطانی گشنیز را در مدل‌های حیوانی به اثبات رسانده است. ایران یکی از عمده‌ترین تولیدکنندگان تجاری دانه گشنیز محسوب می‌شود. گیاه گشنیز در مناطق مختلف ایران از زمان‌های قدیم کشت می‌شده است. در طب سنتی ایران دانه‌های گشنیز به‌طور گسترده به‌منظور درمان اختلالات دستگاه گوارش، فتق، اسهال، کولیت[2] و سایر اختلالات معده مورد استفاده قرار می‌گیرد. دانه گشنیز در پزشکی عمدتاً به‌عنوان یک دارو برای سوء هاضمه، ضدکرم، روماتیسم و درد مفاصل مصرف می‌شود. دانه‌های معطر گشنیز همچنین به‌عنوان ادویه در ترشیجات، پودر کاری، سوسیس، کیک، شیرینی، بیسکویت و نان استفاده می‌شود (Nejad Ebrahimi *et al.*, 2010; Emamghoreishi *et al.*, 2015; Eikani *et al.*, 2007).

اسانس گشنیز در صنعت غذایی به‌عنوان یک طعم‌دهنده تولیدات مواد غذایی همانند نوشابه، کاکائو و شکلات به‌کار برده می‌شود. از این اسانس در علوم پزشکی به‌عنوان یک طعم‌دهنده یا یک عامل ضدنفخ استفاده می‌شود. پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهند که جزء اصلی بذر گشنیز لینالول[3] بوده که این ترکیب فقط در دانه گشنیز موجود می‌باشد (Eikani *et al.*, 2007).

باسیلوس سرئوس[4]، باکتری میله‌ای شکل، از خانواده باسیلاسه می‌باشد. این باکتری می‌تواند باعث بروز مسومیت‌های غذایی شود و علائمی مانند اسهال، درد شکم، سرگیجه و سردرد در بیمار ایجاد می‌کند (Tajkarimi *et al.*, 2010). *سالمونلا تیفی*[5] متعلق خانواده انتروباکتریاسه[6] می‌باشد و می‌تواند باعث بروز بیماری‌هایی مانند تب‌های روده‌ای (حصبه و شبه‌حصبه) در انسان گردد. *اشرشیا کلی*[7]، باکتری گرم منفی و متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه* است. این باکتری یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت در انسان می‌باشد و می‌تواند سبب بروز عفونت‌هایی همانند عفونت ادراری و مننژیت گردد (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2018). سودوموناس باکتری گرم منفی، متعلق به خانواده سودوموناسه است. *سودوموناس آئروژینوزا*[8] در انسان می‌تواند باعث ایجاد زخم‌های عفونی به‌خصوص عفونت گوش میانی گردد (Tajkarimi *et al.*, 2010).

هدف از این پژوهش، شناسایی ترکیبات شیمیایی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، فنول کل و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس دانه گشنیز با روش‌های انتشار در آگار به کمک دیسک (دیسک دیفیوژن)، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* بود.

مواد و روش‌ها

تهیه و استخراج اسانس دانه گشنیز

دانه گشنیز از بازار محلی مشهد تهیه و بعد از تأیید نام علمی گیاه عمل استخراج اسانس انجام شد. به این منظور مقدار ۱۰۰ گرم دانه گشنیز خشک شده به دستگاه کلونجر که اساس کار آن تقطیر آبی است منتقل و به مدت ۳ ساعت اسانس موجود استخراج و پس از جمع‌آوری و آب‌گیری با سولفات سدیم در ظروف تاریک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Haghirossadat *et al.*, 2010).

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس دانه گشنیز

شناسایی ترکیبات اسانس استخراج شده با تزریق ۰/۵ میکرولیتر اسانس استخراجی رقیق شده با سیکلوهگزان به دستگاه گازکروماتوگرافی (Agilent 6890A، چین) حاوی ستون HP-5MS (طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر) متصل به طیف‌سنج جرمی (Agilent 5975، چین) انجام پذیرفت. برنامه دمایی ستون به این طریق تنظیم گردید: دمای ابتدایی آن ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود و دما با سرعت ۵ درجه در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در این دما یک دقیقه باقی ماند و سپس دما با سرعت ۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و پس از ۵ دقیقه توقف در این دما، در نهایت با سرعت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. گاز هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان گاز حامل به‌کار گرفته شد. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به‌ترتیب ۲۴۰ و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. طیف‌سنج جرمی با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت به‌کار گرفته شد. شناسایی نوع ترکیبات اسانس با کمک طیف نرمال آلکان‌ها (C_8-C_{24}) و به‌دست آوردن شاخص بازداری آن‌ها (شاخص کواتز) و مقایسه با

1 Pharmacologic
2 Colitis
3 Linalool
4 *Bacillus cereus*
5 *Salmonella typhi*
6 Enterobacteriaceae
7 *Escherichia coli*
8 *Pseudomonas aeruginosa*

شاخص کواتز (KI)[1] گزارش شده ترکیبات در نرم‌افزار NIST07 و مقایسه طیف جرمی هر یک از اجزای ترکیبات اسانس با طیف جرمی موجود در کتابخانه wiley7n.1 موجود در دستگاه GC/MS[2] صورت پذیرفت. میزان درصد ترکیبات موجود در اسانس مورد بررسی با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی مجهز به آشکارساز FID با شرایط فوق و با استفاده از سطح زیر منحنی پیک‌ها محاسبه گردید (Msaada *et al.*, 2007).

فنول کل اسانس دانه گشنیز

ترکیبات فنول کل اسانس دانه گشنیز با روش رنگ‌سنجی فولین- سیوکالتیو و بر حسب اسید گالیک اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی اسیدگالیک غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسیدگالیک و همچنین غلظت ۱۰ گرم بر لیتر از اسانس دانه گشنیز تهیه شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های فوق با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف فولین- سیوکالتیو مخلوط گردید و بعد از گذشت ۳ تا ۱۸ دقیقه مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از محلول کربنات سدیم ۷/۵٪ به آن‌ها اضافه شود و در نهایت جذب محلول‌ها بعد از گذشت ۲ ساعت در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر wpa (biowaveii، انگلستان) اندازه‌گیری شد. میزان جذب خوانده شده برای اسانس در رابطه به‌دست آمده از نمودار استاندارد اسید گالیک قرار داده شد و به این ترتیب مقدار فنول کل بر حسب غلظت معادل اسید گالیک محاسبه شد (R^2=۰/۹۵۸۷، y=۰/۰۰۲۵ x +۰/۰۳۷۹) (Kähkönen *et al.*, 1999).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس دانه گشنیز

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گشنیز با دو روش ارزیابی درصد مهار رادیکال آزاد ۲،۲ - دی فنیل-۱- پریکیل هیدرازیل (DPPH)[3] و ۲،۲- آزینو بیس –۳- اتیل بنزو تیازولین -۶- سولفونیک اسید (ABTS)[4] اندازه‌گیری شد، در زیر این روش‌ها به اختصار آورده شده است.

رادیکال آزاد ۲،۲- دی فنیل-۱- پریکیل هیدرازیل

فعالیت رادیکال آزاد اسانس دانه گشنیز با استفاده از روش تجزیه رادیکال آزاد ۱،۱- دیفنیل-۲- پریکیل هیدرازیل (DPPH) به‌صورت کمی ارزیابی شد (Wong *et al.*, 2006). به‌طور خلاصه ۱۰۰ میکرولیتر ازغلظت‌های مختلف اسانس (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۹۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) در لوله‌های آزمایش ریخته شد و ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در متانول به لوله‌ها اضافه شد و مخلوط گردید. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در یک محل تاریک در دمای اتاق نگهداری شدند. نمونه کنترل به‌صورت محلول‌های فوق بدون اسانس تهیه شد. از متانول برای صفر کردن دستگاه استفاده شد. جذب نمونه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید. درصد مهارکنندگی اسانس با استفاده از معادله (۱)، محاسبه شد.

$$\text{Free radical scavenging (\%)} = \frac{(A_{blank}-A_{sample})\times 100}{A_{sample}} \quad (۱)$$

در این معادله A_{sample}: جذب محلول DPPH پس از واکنش با غلظت معینی از اسانس و A_{blank}: جذب محلول DPPH با متانول به‌جای اسانس می‌باشد.

۲، ۲- آزینو بیس- ۳- اتیل بنزو تیازولین- ٦- سولفونیک اسید

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس دانه گشنیز با روش ABTS مطابق با مطالعه Shan و همکاران (۲۰۰۶)، با اندکی اصلاحات انجام شد. برای انجام این آزمون محلول ۷ میلی‌مولار ABTS و محلول ۲/۴۵ میلی‌مولار پرسولفات پتاسیم در آب تهیه شد و به نسبت یکسان با هم مخلوط گردید. محلول حاصل به مدت ۱۶ساعت درتاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. در این مدت اکسیداسیون و تولید رادیکال $ABTS^+$ به‌وسیله پتاسیم پرسولفات انجام می‌گردد. قبل از آزمون، محلول $ABTS^+$ با متانول تا جذب ۰/۲۰۰ ±۰/۷۰۰ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. پس از آن ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های اسانس دانه گشنیز به ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول ABTS رقیق شده افزوده و بعد از گذشت ۶ دقیقه جذب آن به‌وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۳۴ نانومتر قرائت شد. نمونه کنترل به‌صورت محلول‌های فوق بدون اسانس تهیه شد و متانول برای صفرکردن دستگاه مورد استفاده قرار گرفت. درصد مهارکنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله (۲)، محاسبه شد.

$$AA\ (\%) = \frac{(A_{blank}-A_{sample})\times 100}{A_{sample}} \quad (۲)$$

در این معادله A_{sample}: جذب محلول ABTS پس از واکنش با غلظت معینی از اسانس و A_{blank}: جذب محلول ABTS با متانول به‌جای اسانس می‌باشد.

1 Kovats Index
2 Gas chromatography mass spectrometry
3 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
4 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

تهیه و آماده‌سازی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا

در این پژوهش از ۴ باکتری بیماری‌زا شامل: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Escherichia coli* ATCC 25922، *Salmonella typhi* ATCC 14028 و *Bacillus cereus* ATCC 14579 استفاده شد. تمامی سویه‌های میکروبی مورد استفاده در این مطالعه به‌صورت لیوفیلیزه در آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان وجود داشت.

تهیه کشت تازه از سویه‌های میکروبی

برای تهیه کشت تازه از میکروارگانیسم‌ها یک روز قبل از انجام آزمون‌های میکروبی از هر سویه میکروبی بر محیط کشت مولر هینتون آگار کشت سطحی انجام شد. سوسپانسیون سویه‌های میکروبی براساس کدورت نیم مک‌فارلند (colony forming unit/mL $۱/۵×۱۰^۸$) تنظیم شد

بررسی فعالیت ضدمیکروبی اسانس دانه گشنیز روش دیسک دیفیوژن

در این روش ابتدا یک سوسپانسیون استاندارد میکروبی بر محیط کشت مولر هینتون آگار به روش سطحی کشت داده شد. دیسک‌های خالی (شرکت پادتن طب، ایران) با فاصله معین از یکدیگر و از دیواره پلیت روی محیط کشت قرار داده شد. ۲۰ میکرولیتر از اسانس دانه گشنیز به آرامی به دیسک‌ها اضافه گردید. برای استریل کردن اسانس قبل از اضافه کردن آن‌ها به دیسک، از فیلتر سر سرنگی با اندازه ذرات ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به‌عنوان کنترل استفاده شد. در انتها پلیت‌های حاوی باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از گذشت مدت زمان گرمخانه‌گذاری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش شد (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2017).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد

به‌منظور اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی از رشد از روش رقیق‌سازی در مایع (میکرودایلوشن براث)[1] استفاده شد. برای ساختن غلظت‌های میکروبی مقدار ۵/۱۲ گرم از اسانس گشنیز و ۰/۵ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید به ۹/۵ میلی‌لیتر مولر هینتون براث اضافه شده و برای جلوگیری از دو فاز شدن عمل ورتکس انجام گردید. مقدار ۵ میلی‌لیتر از غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه کرده و به همین صورت تا غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ساخته شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ساخته شده به میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته و مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به آن اضافه شد. کنترل مثبت و کنترل منفی نیز برای هر باکتری در نظرگرفته شد. کنترل مثبت شامل ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌ها و کنترل منفی شامل ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسون میکروبی بود. میکروپلیت ۹۶ خانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت پس از گذشت ۲۴ ساعت از گرمخانه‌گذاری، میکروپلیت‌ها از انکوباتور بیرون آورده و ۲۰ میکرولیتر معرف رنگی تترازولیوم کلراید ۵ درصد به هر خانه اضافه شد و به مدت نیم ساعت گرمخانه‌گذاری شد. خانه‌هایی که باکتری در آن‌ها رشد کرده بود به رنگ قرمز تغییر یافت. اولین خانه‌ای که در آن تغییر رنگ مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی گزارش شد (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2017; Yeganegi *et al.*, 2018).

تعیین حداقل غلظت کشندگی

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس دانه گشنیز مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر چاهک که در آن تغییر رنگ دیده نشد، به محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال و کشت داده شد. کمترین غلظتی از اسانس که فاقد کلنی باکتری بود به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2017; Yeganegi *et al.*, 2018).

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

از آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. جهت مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزارSPSS (نسخه ۲۵) استفاده شد. تمامی آزمون‌ها ۳ بار تکرار گردید.

نتایج و بحث

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس دانه گشنیز

گیاهان دارویی به لحاظ درمان و پیشگیری از بیماری‌ها ارزش و اهمیت فراوانی دارند. استفاده از گیاهان دارویی در پزشکی و طب سنتی قدمتی طولانی دارد. در سالیان اخیر به دلیل افزایش آگاهی مردم از خطرات و عوارض جانبی استفاده از داروها و آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی و سنتزی تمایل به استفاده از گیاهان دارویی و طبیعی به‌عنوان جایگزین داروهای سنتزی رو به فزونی گذاشته است. علاقه به مصرف مواد ضدمیکروبی، طبیعی و غیرسنتزی به عنوان یک جایگزین بالقوه برای مهارکننده‌های رشد میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت افزایش یافته است. اسانس‌ها منبع خوبی از ترکیبات زیست‌فعال هستند که دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بوده و می‌توانند

1 Micro-dilution broth

به‌عنوان جایگزین داروهای سنتزی استفاده شوند (Calo *et al.*, 2015). از این‌رو این پژوهش با اهداف شناسایی ترکیبات شیمیایی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس دانه گشنیز انجام پذیرفت.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی شناسایی شده اسانس دانه گشنیز

ردیف	ترکیب	شاخص کواتز	زمان بازداری (min)	درصد
۱	α-Pinene	۹۲۸	۹/۴۹۵	۲/۴۰
۲	Camphene	۹۳۳	۱۰/۱۵۱	۰/۴۱
۳	β-Pinene	۹۵۱	۱۱/۴۸۴	۰/۱۸
٤	β-Myrcene	۹۶۴	۱۲/۳۰۵	۰/۲۵
٥	p-Cymene	۱۰۱۲	۱۳/۹۰۵	۱/۸۳
٦	Limonene	۱۰۲۳	۱۴/۰۸۹	۱/۰۸
۷	δ-Terpinene	۱۰۵۴	۱۵/۶۲۸	۱/۵۹
۸	Linalool oxide	۱۰۸۵	۱۶/۳۳۶	۰/۹۸
۹	Linalool	۱۱۰۴	۱۷/۹۸۷	۷۶/۷۵
۱۰	Camphor	۱۱۳۸	۱۹/۸۳۲	۵/۲۲
۱۱	Borneol	۱۱۶۶	۲۰/۹۴۱	۰/۱۹
۱۲	4-Terpineol	۱۱۷۸	۲۱/۴۹۵	۰/۳۱
۱۳	α-Terpineol	۱۱۹۰	۲۲/۱۸۲	۰/۵۱
۱٤	Decanal	۱۱۹۳	۲۲/۶۰۲	۰/۷۵
۱٥	Citral	۱۲۴۲	۲۴/۲۴۸	۰/۰۴
۱٦	Geraniol	۱۲۵۵	۲۵/۹۵۶	۲/۱۱
۱۷	Anethole	۱۲۹۶	۲۶/۶۱۳	۰/۰۹
۱۸	Geranyl acetate	۱۳۸۷	۳۰/۹۶۱	۲/۹۹
۱۹	Dodecanal	۱۴۰۷	۳۱/۵۹۷	۰/۳۵
۲۰	Caryophyllene	۱۴۱۸	۳۲/۳۷۷	۰/۰۵
۲۱	Tetradecanal	۱۶۱۱	۳۹/۶۱۸	۰/۱۵
	Monoterpene hydrocarbons			۷/۷۴
	Monoterpenes oxygenated			۸۹/۹۴
	Sesquiterpene hydrocarbons			۰/۰۵
	Sesquiterpene oxygenated			۰/۵
کل				۹۸/۲۳

نتایج شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس دانه گشنیز با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی در جدول ۱، آورده شده است. براساس نتایج مشخص گردید که اسانس دانه گشنیز دارای ۲۱ ماده فرار بوده که در مجموع ۹۸/۲۳ درصد از کل ترکیبات آن را تشکیل می‌دهد. براساس این نتایج اسانس دانه گشنیز غنی از مونوترپن‌های اکسیژن‌دار (۸۹/۹۴ درصد) می‌باشد. ترکیب عمده اسانس دانه گشنیز

لینالول (۷۶/۷۵ درصد) بود. علاوه بر این کامفور[1] (۵/۲۲ درصد)، گرانیل استات[2] (۲/۹۹)، آلفاپینن[3] (۲/۴۰ درصد)، گرانیول[4] (۲/۱۱درصد) و پی‌سیمین[5] (۱/۸۳ درصد) به‌عنوان دیگر ترکیبات غالب اسانس دانه گشنیز بودند.

Msaada و همکاران (۲۰۰۷)، ترکیبات اسانس دانه گشنیز را در سه مرحله بلوغ با استفاده از GC-FID[6] و GC-MS در تونس مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران مشخص کرد که گرانیل استات (۴۶/۲۷ درصد)، لینالول (۱۰/۹۶ درصد)، نرول (۱/۵۳ درصد) و نرال (۱/۴۲ درصد) ترکیبات اصلی در مرحله اول بلوغ (دانه‌های نابالغ) بودند. در مرحله میانی، لینالول (۷۶/۳۳ درصد)، سیس دی‌هیدروکارول (۳/۲۱ درصد) و گرانیل‌استات (۲/۸۵ درصد) به‌عنوان ترکیب اصلی گزارش شد. روغن‌های ضروری در مرحله نهایی بلوغ (میوه‌های بالغ) عمدتاً شامل لینالول (۸۷/۵۴ درصد) و سیس دی‌هیدروکارول (۲/۳۶ درصد) بود. در مجموع، نتایج گزارش شده تفاوت زیادی را بین ترکیبات اسانس دانه گشنیز طی مراحل مختلف بلوغ نشان داد، به‌طوری که بیشترین ترکیب در اسانس دانه گشنیز در مرحله رسیده و میانی متعلق به لینالول بود. نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر کاملاً مطابقت داشت، هرچند درصد ترکیب لینالول در پژوهش حاضر کمتر بود. پژوهش‌های متعددی دلیل این امر را به تفاوت‌های اکولوژیکی مرتبط دانسته‌اند (Noshad *et al.*, 2018; Alizadeh Behbahani *et al.*, 2018;Alizadeh Behbahani *et al.*, 2017). Khalil و همکاران (۲۰۱۸) ترکیبات شیمیایی و ضدمیکروبی اسانس‌های میوه‌های خانواده Apiaceae کشت شده، در کشور مصر را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش ترکیبات شیمیایی اسانس‌های زیره سیاه، گشنیز و زیره سبز به‌وسیله کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی مورد شناسایی قرار گرفت. در مجموع به‌ترتیب ۱۰، ۱۸ و ۱۵ ترکیب برای اسانس‌های زیره سیاه، گشنیز و زیره سبز شناسایی شد. نتایج این پژوهشگران نشان داد که مونوترپنوئیدها فراوان‌ترین اجزا در ترکیب هر سه اسانس بودند. لینالول با ۷۰/۹۳٪ بیشترین ترکیب شناسایی شده در اسانس گشنیز بود. Ravi و همکاران (۲۰۰۷) ترکیب شیمیایی بذرهای گشنیز جمع آوری از هشت منطقه کشور هند را با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی مورد شناسایی قرار دادند. آنالیز کروماتوگرافی گازی حضور ۳۰ ترکیب در اسانس گشنیز را نشان داد. لینالول که عطر و بوی مطبوع گشنیز مربوط به آن می‌باشد ترکیب اصلی (۵۶/۷۱ -۷۵/۱۴) اسانس در همه نمونه‌ها بود. نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر تا حدود زیادی همخوانی داشت. قادری و همکاران (۲۰۱۲) ترکیبات شیمیایی و اثر ضدباکتریایی اسانس سه گیاه گشنیز، بومادران و شوید در شرایط آزمایشگاهی را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش اندام‌های هوایی گیاه بومادران، بذرهای گشنیز و شوید از مناطق مختلف شهرستان گرگان جمع‌آوری شد. ترکیبات آن‌ها توسط کروماتوگرافی گازی مورد شناسایی قرار گرفت. بیشترین ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس برای گشنیز، D–کارون (۳۴/۵۰٪) بود. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش هر سه اسانس اثر ضدمیکروبی قابل توجهی بر باکتری‌های مورد مطالعه داشتند. مقایسه نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های ما نشان داد که نوع ترکیب شناسایی شده در اسانس گشنیز متفاوت بود. Nejad Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۰) ترکیبات اسانس گونه‌های مختلف گشنیز در ایران (خرم‌آباد، یاسوج، همدان، یزد، لاهیجان، تبریز و ...) را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش پروفایل‌های شیمیایی اسانس گونه‌های مختلف گشنیز با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی مورد بررسی قرار گرفت. محتوای اسانس دانه‌های خشک شده از ۰/۱ تا ۰/۳۶ درصد متغیر بود. لینالول (۷۹/۹-۴۰/۹٪)، نیریل استات (۲/۱۴-۲/۳٪)، γ–ترپینن (۱۳/۶-۰/۱٪) و α–پینن (۲/۱-۷/۱٪) به‌عنوان اجزای اصلی در اسانس گشنیز بودند. تقریباً تمام گونه‌های مورد مطالعه حاوی بیش از۶۰٪ لینالول بودند. تغییرات در مشخصات شیمیایی اسانس گشنیز در مناطق مختلف، مربوط به عوامل مؤثر بر ترکیب شیمیایی اسانس، یعنی شرایط ژنتیکی، آب و هوایی، فصلی و جغرافیایی و همچنین تغییرات در متابولیسم ثانویه، اثر زمان کاشت، مرحله رشد، تنش‌های زیستی مانند خشکسالی یا شوری عملکرد و ترکیب اسانس را تغییر می‌دهد. علاوه بر این تکنیک‌های استخراج و شرایط ذخیره‌سازی نیز می‌تواند ترکیبات اسانس را تحت تأثیر قرار دهد (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2018; Alizadeh Behbahani *et al.*, 2017; Laribi *et al.*, 2015).

تعیین ویژگی‌های ضداکسایشی و فنول کل اسانس دانه گشنیز

مقدار ترکیبات فنول کل موجود در اسانس دانه گشنیز ۳۸/۰۴ ±۰/۰۲ mg GAE/g بود. فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد

1 Camphor
2 Geranyl acetate
3 α-Pinene
4 Geraniol
5 p-Cymene
6 Gas chromatography – flame ionization detector

۲،۲- دی فنیل —۱- پریکیل هیدرازیل (DPPH) و ۲،۲ آزینو بیس- ۳ -اتیل بنزو تیازولین — ۶ - سولفونیک اسید (ABTS) اسانس دانه گشنیز در غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تعیین گردید. نتایج به‌دست آمده با آنتی‌اکسیدان سنتزی استاندارد BHA[1] مقایسه شد. همانطور که در جدول ۲، مشاهده می‌شود با افزایش غلظت اسانس میزان مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش یافت، به‌طوری که بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد برای DPPH، ۵۳/۷۵ درصد و برای ABTS، ۶۶/۶۰ درصد در غلظت ۹۰۰ ppm و کمترین قدرت مهارکنندگی DPPH، ۳۱/۹۱ درصد و ABTS، ۱۹/۴۸ درصد در غلظت ۱۰۰ ppm مشاهده شد. در مجموع عملکرد پایین‌تر رادیکال DPPH نسبت به رادیکال ABTS مشاهده شد. در هر دو روش نمونه‌ها فعالیت ضداکسیدانی کمتر نسبت به BHA مشاهده گردید. اثر آنتی‌اکسیدانی رادیکال‌های DPPH برای اسانس دانه‌گشنیز، ۱/۱۲± ۳۱٪/۹۱ معادل با ۴/۷۵ ±۸۶٪/۳ BHA در غلظت ۱۰۰ ppm و برای رادیکال ABTS، ۰/۶۶±۱۹٪/۴۸ معادل۴/۶۳ ±۸۷٪/۸ BHA در همان غلظت بود.

Saxena و همکاران (۲۰۱۵) اثر انجماد بر اسانس، محتوای الئورزین و خواص ضداکسیدانی ژنوتیپ‌های گشنیز در هند را مورد مطالعه قرار دادند. مقدار فنول کل دانه ژنوتیپ‌های مختلف گشنیز که تحت تأثیر انجماد قرار نگرفته بودن از۱۹/۴۶ mg GAE/g در ژنوتیپ Sudha تا حداکثر ۶۲/۳۹ mg GAE/g در ژنوتیپ RCr 436 متغیر بود. Alves-Silva و همکاران (۲۰۱۳) ویژگی‌های ضدمیکروبی و ضداکسیدانی اسانس‌های گیاهان پرکاربرد مورد استفاده در کشور پرتغال را بررسی نمودند. در این پژوهش میزان فنول کل برای اسانس گشنیز ۵۲/۳ mg GAE/L به‌دست آمد. میزان فنول کل اسانس گشنیز در مطالعه Wangensteen و همکاران (۲۰۰۴) در نروژ ۰/۱۴ g GAE /۱۰۰g بود. این نتایج کمتر از یافته‌های ما در این پژوهش بود. به‌طور کلی مقایسه نتایج پژوهش‌های انجام شده در کشورهای مختلف با یافته‌های پژوهش حاضر تا حدود زیادی همخوانی داشت. تفاوت‌های مشاهده شده در میزان فنول کل را می‌توان به شرایط جغرافیایی، آب و هوایی، نوع خاک و شرایط استخراج اسانس مرتبط دانست (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2017; Saboura *et al.*, 2014).

جدول ۲- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس دانه گشنیز با رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS

غلظت اسانس (µg/mL)	درصد مهارکنندگی	
	DPPH	ABTS
۱۰۰	۳۱/۹۱±۱/۱۲^E	۱۹/۴۸±۰/۶۶^E
۳۰۰	۳۴/۶۶±۰/۳۸^D	۴۲/۴۴±۰/۵۷^D
۵۰۰	۴۱/۹۱±۰/۸۷^C	۵۲/۸۱±۰/۱۵^C
۷۰۰	۴۸/۲۵±۰/۷۵^B	۶۰/۳۴±۰/۱۸^B
۹۰۰	۵۳/۷۵±۱/۲۵^A	۶۶/۶۰±۰/۱۸^A

آزمون DPPH توانایی عصاره یا اسانس را برای اهدای هیدروژن به رادیکال DPPH اندازه‌گیری کرده و موجب سفید شدن محلول DPPH می‌شود هرچه محلول سفیدتر شود نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر است. فعالیت ضدرادیکالی اسانس‌ها ممکن است به جایگزینی گروه‌های هیدروکسیل در سیستم‌های حلقه معطر ترکیبات فنل به دلیل قابلیت هضم هیدروژنی آن‌ها نسبت داده شود (Williams *et al.*, 1995; Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Brand-Kaur و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی با محتوای فنول کل رابطه مستقیم و معنی‌داری دارد. Shalaby و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH و ABTS اسانس‌های سیر، پیاز، زیره، گشنیز و جعفری را بررسی نمود. در هر دو آزمون آنزیل هیدروکسی بوتیل (BHA) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. تمام اسانس‌های مورد آزمایش نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش از ۵۰٪ نسبت به رادیکال DPPH و ABTS بود. نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی نداشت. Farah و همکاران (۲۰۱۵) فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره اتانولی جعفری و گشنیز در کشور عربستان را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش عصاره برگ و دانه هر دو گیاه گشنیز و جعفری قدرت مهار رادیکال DPPH بالاتری نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT داشت. لینالول، کامفور، گرانیل‌استات، آلفاپینن، گرانیول و پی‌سیمین ترکیبات اصلی اسانس دانه گشنیز را تشکیل می‌دهند. این ترکیبات شناخته شده دارای فعالیت

1 Butylated hydroxyl anisole

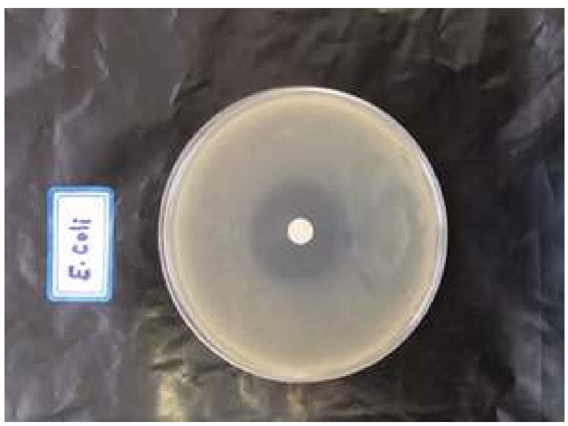
ضداکسیدانی بالایی می‌باشد (Fayed *et al.*, 2009; Emami *et al.*, 2007).

فعالیت ضدمیکروبی اسانس دانه گشنیز

نتایج حاصل از اثر ۲۰ میکرولیتر اسانس دانه گشنیز بر قطر هاله‌های عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در جدول ۳، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که در روش دیسک دیفیوژن بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری *باسیلوس سرئوس* (۳۰/۳۰ میلی‌متر) و کمترین هاله عدم رشد مربوط به باکتری *سالمونلا تیفی* (۲۳/۱۵ میلی‌متر) بود. قطر هاله عدم رشد برای باکتری گرم مثبت برابر با ۳۰/۳۰ میلی‌متر و برای آنتی‌بیوتیک جنتامایسین برابر با ۲۶/۱۲ میلی‌متر محاسبه شد. همچنین میانگین هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم منفی برابر با ۲۵/۸۳ میلی‌متر و برای آنتی‌بیوتیک جنتامایسین برابر با ۲۵/۷۲ میلی‌متر برآورد شد. نتایج نشان داد که اسانس دانه گشنیز اثر ضدمیکروبی قوی‌تری نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتاماسین داشت. در شکل ۲، اثر ضدباکتریایی اسانس دانه گشنیز بر باکتری *اشرشیاکلی* نشان داده شده است.

جدول ۳- میانگین قطر هاله عدم رشد (mm) به روش انتشار در آگار به کمک دیسک بر باکتری‌های بیماری‌زا

ماده ضدمیکروبی/باکتری	*باسیلوس سرئوس*	*اشرشیا کلی*	*سودوموناس ائروژینوزا*	*سالمونلا تیفی*
اسانس گشنیز (دیسک)	۳۰/۳۰±۰/۳۰ ^{Aa}	۲۹/۲۰±۰/۱۰ ^{Ab}	۲۵/۱۵±۰/۲۵ ^{Ac}	۲۳/۱۵±۰/۱۵ ^{Bd}
جنتامایسین	۲۶/۰۵±۰/۲۵ ^{Bc}	۲۷/۰۵±۰/۱۵ ^{Bb}	۲۰/۰۵±۰/۵۰ ^{Bd}	۳۰/۰۵±۰/۵۵ ^{Aa}



شکل ۲- نمایی از اثر ضدباکتریایی اسانس دانه گشنیز بر باکتری *اشرشیاکلی*.

جدول ٤- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت‌کشندگی (MBC) اسانس دانه گشنیز به روش رقیق‌سازی در مایع بر باکتری‌های بیماری‌زا

باکتری	MIC	MBC
باسیلوس سرئوس	۲	۵۱۲
اشرشیا کلی	۴	>۵۱۲
سودوموناس ائروژینوزا	۴	۵۱۲
سالمونلا تیفی	۴	>۵۱۲

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت‌کشندگی اسانس دانه گشنیز بر باکتری‌های بیماری‌زا در جدول ۴، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس دانه گشنیز برای باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیاکلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *سالمونلاتیفی* به‌ترتیب برابر با ۲، ۴، ۴ و۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی اسانس دانه گشنیز برای باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *سودوموناس ائروژینوزا*، برابر۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای *اشرشیاکلی* و *سالمونلا تیفی* بیشتر از ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر اسانس دانه گشنیز حساس‌تر هستند. نتایج این پژوهش با گزارش‌های Matasyoh و همکاران (۲۰۰۹)، Silva و همکاران (۲۰۱۱)، که اثر اسانس دانه گشنیز را روی چندین میکروارگانیسم بیماری‌زا گرم مثبت و گرم منفی به‌کار برده بودند مطابقت داشت. برومند و همکاران (۲۰۰۸) اثر ضدمیکروبی اسانس بذر گشنیز را روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* O157:H7 و *سالمونلا تیفی‌موریوم* با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع (میکرو دایلوشن براث) مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققین نشان داد که باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی* به‌ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری نسبت به اسانس گشنیز بودند. یافته‌های این پژوهشگران با نتایج اثر فعالیت ضدمیکروبی اسانس دانه گشنیز به روش دیسک دیفیوژن در این پژوهش مطابقت داشت. اسانس بذر گشنیز دارای MIC و MBC برابر با ppm ۱۰۰۰ و در مورد *سالمونلا تیفی موریوم* اسانس در هیچ غلظتی اثر بازدارندگی نداشت که با نتایج ما مطابقت نداشت. قادری و همکاران (۱۳۹۱) اثر ضدمیکروبی برگ گیاه گشنیز، بومادران و شوید را بر چهار باکتری بیماری‌زا *اشرشیاکلی*، *باسیلوس‌سرئوس*، *باسیلوس لیچنی فورمیس*[1] و *سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که برای مهار رشد باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *باسیلوس لیچنی فورمیس*، اسانس شوید با غلظت ppm ۳۱۲/۵ و برای مهار رشد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب اسانس گیاهان گشنیز و بومادران با غلظت‌های ppm ۱۲۵۰ و ppm ۳۱۲/۵ مؤثرتر واقع شدند. این پژوهش نشان داد که اسانس گشنیز بیشترین اثر را بر باکتری *باسیلوس سرئوس* دارد که با نتایج ما مطابقت داشت. فرشباف‌درهمی و همکاران (۲۰۱۶) اثر ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه گشنیز را روی باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* با روش چاهک و میکروپلیت (برای تعیین MIC و MBC) بررسی کردند. در این پژوهش عصاره آبی گشنیز هیچ تأثیری بر باکتری‌های ذکر شده نداشت. نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی نداشت. Teshale و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت ضدمیکروبی اسانس دانه گشنیز بر باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *سالمونلا تیفی* را مورد بررسی قرار دادند. قطر هاله مهارکنندگی در روش دیسک برای باکتری‌های فوق به‌ترتیب ۲۵، ۱۰ و ۱۸ میلی‌متر بود. مقایسه یافته‌های این پژوهشگران با نتایج پژوهش حاضر تا حدودی همخوانی داشت، هر چند در مطالعه ما قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های مذکور به‌ترتیب ۲۹/۲۰، ۲۵/۱۵، ۲۳/۱۵ میلی‌متر بود. Dua و همکاران (۲۰۱۴) اثر ضدمیکروبی عصاره متانولی دانه گشنیز بر باکتری‌های بیماری‌زا *اشرشیاکلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس پومیلوس*[2] به روش چاهک در آگار بررسی کردند. قطر هاله بازدارندگی برای عصاره‌ها بین ۱۱/۹۳ تا ۱۷/۲۷ میلی‌متر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های مورد مطالعه۴/۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. نتایج این پژوهش نسبت به یافته‌های ما برای قطر هاله بازدارندگی میکروارگانیسم‌های مشابه کمتر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی تقریباً مشابه یافته‌های پژوهش حاضر بود. اسانس به سبب غلظت بالا، نسبت به عصاره تأثیر ضدمیکروبی کمتری دارد. Mansouri و همکاران (۲۰۱۸) فعالیت ضدمیکروبی دو اسانس آویشن و گشنیز نسبت به چندسویه *اشرشیا کلی* را درکشور الجزایر مورد بررسی قرار دادند. میانگین قطر هاله عدم رشد برای اسانس گشنیز ۰/۳۸۳±۱۷/۰۵ میلی‌متر بود که کمتر از قطر هاله عدم رشد برای *اشرشیا کلی* در تحقیق حاضر (۰/۱۰±۲۹/۲۰) بود. حداقل غلظت بازدارندگی اسانس گشنیز برای نژادهای مختلف *اشرشیاکلی* بین ۰/۶ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که با حداقل غلظت‌کشندگی در این پژوهش (۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مطابقت داشت. تفاوت در فعالیت ضدمیکروبی مشاهده شده را می‌تواند به درصد ترکیبات اسانس گشنیز در مناطق مختلف مربوط دانست. Khalil و همکاران (۲۰۱۸) اثر ضدمیکروبی اسانس دانه گشنیز را به روش چاهک در آگار مورد بررسی قرار دادند. منطقه مهاری اسانس دانه گشنیز برای باکتری *اشرشیاکلی* ۱۹ میلی‌متر بود این نتایج با یافته‌های ما مطابقت داشت. باکتری‌های گرم منفی به دلیل دارا بودن یک لایه گلیکوپپتیدی در غشای خارجی خود، مقاومت بیشتری در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت در برابر اسانس‌ها از خود نشان می‌دهند، زیرا این لایه خارجی مانع از تماس مستقیم ترکیبات آب‌گریز اسانس با دیواره سلولی فسفولیپیدی این باکتری‌ها می‌شود، درصورتی که در باکتری‌های گرم مثبت این ترکیبات آبگریز در تماس مستقیم با سلول قرارگرفته و اقدام به تخریب دیواره می‌کنند (Azhdarzadeh *et al.*, 2016; Mansouri *et al.*, 2018; Tabatabaei-Yazdi *et al.*, 2015).

نتایج نشان داد که اسانس دانه گشنیز در روش دیسک دیفیوژن در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین اثر بازدارندگی بیشتری بر رشد باکتری‌های مورد بررسی به‌جز *سالونلا تیفی* داشت ($P<0.05$). دلیل این امر را می‌توان به مقدار زیاد ترکیب لینالول (۷۶/۷۵٪) به‌عنوان ماده اصلی اسانس مرتبط دانست. پژوهش‌های مختلف اثر ضدمیکروبی اسانس گشنیز را بیشتر مربوط به ترکیب اصلی آن (لینالول) مرتبط می‌دانند که هم بر باکتری‌های گرم مثبت و هم بر باکتری‌های گرم

1 *Bacillus licheniformis*
2 *Bacillus pvmylvs*

منفی اثر بازدارندگی بسیار مطلوبی دارد Alizadeh Behbahani *et al.*, 2016; Duman *et al.*, 2010; Delaquis *et al.*, 2002).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش ترکیبات شیمیایی اسانس دانه گشنیز با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی شناسایی شد. ترکیبات شیمیایی اسانس دانه گشنیز در مجموع ۹۸/۲۳ درصد بود که بخش عمده آن را مونوترپن‌های اکسیژن‌دار تشکیل می‌داد. نتایج وجود ترکیبات فنلی و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس دانه گشنیز را تایید کرد. اثر ضدمیکروبی اسانس دانه گشنیز بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود به طوری که بیشترین و کمترین هاله عدم رشد به‌ترتیب مربوط به باکتری *باسیلوس سرئوس* و *سالونلا تیفی* بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله برخود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

حقیرالسادات، ف.، برنارد، ف.، کلانتر، م.، شیخها، م.ح.، حکم اللهی، ف.، عظیم زاده، م.، حوری، م.، ۱۳۸۹ . بررسی ترکیبات موثر و خواص آنتی اکسیدانی اسانس گیاه دارویی زیره سیاه. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ۱۸(۳)، ۲۹۱-۲۸۴.

قادری، س.، فلاحتی حسین آباد، ا.، سرایلو، م.ح.، قنبری، و.، ۱۳۹۱. بررسی ترکیبات و اثرضدباکتریایی اسانس سه گیاه گشنیز، بومادران و شوید در شرایط آزمایشگاهی. مجله علوم پزشکی شهرکرد،۱۴(۵)، ۸۲ -۷۴.

صبورا، ع.، احمدی، ا.، زینالی، ا.، پارسا، م.، ۱۳۹۳ . مقایسه محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی دو جمعیت گیاه بشقابی سنبله‌ای (*Scutellaria Pinnatifida*) در شمال ایران. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، ۱۳ (۳)، ۲۴۹-۲۶۶.

برومند، ع.، حامدی، م.، امام جمعه، ز.، رضوی، س.ه.، گلمکانی، م.ت.، ۱۳۸۷ . بررسی خاصیت ضدمیکروبی اسانس بذرهای شوید *graveolens*) *Anethum*) و گشنیز (*sativum Coriangrum*) برروی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلیH7:O157، سالمونلا تیفی‌موریوم با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع. پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۴ (۱)، ۶۸-۵۹.

فرشباف درهمی، س.، قیامی‌راد، م.، رازق، م.، ۱۳۹۵ . بررسی مقایسه‌ای تأثیر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی گشنیز(*Coriandrum sativum*) بر روی برخی باکتری‌های پاتوژن. بهداشت مواد غذایی،۶ (۲۳)، ۴۲-۳۵.

Afsharzadeh, M., Naderinasab, M., Najaran, Z. T., Barzin, M., & Emami, S. A., 2013. In-vitro antimicrobial activities of some iranian conifers. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1), 63.

Alves-Silva, J. M., dos Santos, S. M. D., Pintado, M. E., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., & Viuda-Martos, M., 2013. Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control*, 32(2), 371-378.

Azhdarzadeh, F., & Hojjati, M., 2016. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(1), 43-50.

Alizadeh Behbahani, B., & Fooladi, A. A. I., 2018. Antibacterial activities, phytochemical analysis and chemical composition Makhlaseh extracts against the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial Pathogenesis*, 114, 204-208.

Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M., 2017. Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 515-526.

Alizadeh Behbahani, B., Yazdi, F. T., Noorbakhsh, H., Riazi, F., Jajarmi, A., & Yazdi, F. T., 2016. Study of the antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of *Myrtus communis* on pathogenic strains causing infection. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 18(2), 5989.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems–A review. *Food Control*, 54, 111-119.

Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 101-109.

Dua, A., Garg, G., Kumar, D., & Mahajan, R., 2014. Polyphenolic composition and antimicrobial potential of methanolic coriander (*Coriandrum sativum*) seed extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(6), 2302.

Duman, A. D., Telci, I., Dayisoylu, K. S., Digrak, M., Demirtas, İ., & Alma, M. H., 2010. Evaluation of bioactivity of linalool-rich essential oils from *Ocimum basilucum* and *Coriandrum sativum* varieties. *Natural Product Communications*, 5(6), 969-974.
Eikani, M. H., Golmohammad, F., & Rowshanzamir, S., 2007. Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Food Engineering*, 80(2), 735-740.
Emamghoreishi, M., & Heidari-Hamedani, G., 2006. Sedative-hypnotic activity of extracts and essential oil of coriander seeds. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 31(1), 22-27.
Emami, S. A., Javadi, B., & Hassanzadeh, M. K., 2007. Antioxidant Activity of the Essential Oils of Different Parts of *Juniperus communis*. *subsp*. *hemisphaerica*. and *Juniperus oblonga*. *Pharmaceutical Biology*, 45(10), 769-776.
Farah, H., Elbadrawy, E., & Al-Atoom, A. A., 2015. Evaluation of anti-oxidant and antimicrobial activities of ethanolic extracts of parsley (*Petroselinum erispum*) and coriander (*Coriandrum sativum*) plants grown in saudi arabia. *International Journal of Advanced Research*, 3, 1244-1255.
Fayed, S. A., 2009. Antioxidant and anticancer activities of *Citrus reticulate* (Petitgrain Mandarin) and *Pelargonium graveolens* (Geranium) essential oils. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(5), 740-747.
Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962.
Kaur, C., & Kapoor, H. C., 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(2), 153-161.
Khalil, N., Ashour, M., Fikry, S., Singab, A. N., & Salama, O., 2018. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of selected Apiaceous fruits. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 88-92.
Laribi, B., Kouki, K., M'Hamdi, M., & Bettaieb, T., 2015. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. *Fitoterapia*, *103*, 9-26.
Mansouri, N., Aoun, L., Dalichaouche, N., & Hadri, D., 2018. Yields, chemical composition, and antimicrobial activity of two Algerian essential oils against 40 avian multidrug-resistant Escherichia coli strains. *Veterinary World*, 11(11), 1539.
Matasyoh, J. C., Maiyo, Z. C., Ngure, R. M., & Chepkorir, R., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry*, 113(2), 526-529.
Msaada, K., Hosni, K., Taarit, M. B., Chahed, T., Kchouk, M. E., & Marzouk, B. (2007). Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. *Food Chemistry*, 102(4), 1131-1134.
Nejad Ebrahimi, S., Hadian, J., & Ranjbar, H. (2010). Essential oil compositions of different accessions of *Coriandrum sativum* L. from Iran. *Natural Product Research*, 24(14), 1287-1294.
Noshad, M., Hojjati, M., & Alizadeh Behbahani, B., 2018. Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microbial Pathogenesis*, 116, 153-157.
Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 39.
Ravi, R., Prakash, M., & Bhat, K. K., 2007. Aroma characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) oil samples. *European Food Research and Technology*, 225(3-4), 367-374.
Saxena, S. N., Sharma, Y. K., Rathore, S. S., Singh, K. K., Barnwal, P., Saxena, R., ... & Anwer, M. M., 2015. Effect of cryogenic grinding on volatile oil, oleoresin content and anti-oxidant properties of coriander (*Coriandrum sativum* L.) genotypes. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 568-573.
Shalaby, E. A., Nasr, N. F., & El Sherief, S. M., 2011. An in vitro study of the antimicrobial and antioxidant efficacy of some nature essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(6), 922-931.
Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H., 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7749-7759.
Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonca, D. I., & Domingues, F. C., 2011. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida species* and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 19(1), 42-47.
Tabatabaei-Yazdi, F., Alizadeh-Behbahani, B., & Zanganeh, H., 2015. The comparison among antibacterial activity of *Mespilus germanica* extracts and number of common therapeutic antibiotics “in vitro”. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 17(12), 5190.
Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199-1218.
Teshale, C., Hussien, J., & Jemal, A., 2013. Antimicrobial activity of the extracts of selected Ethiopian aromatic medicinal plants. *Spatula DD*, 3(4), 175-180.
Wangensteen, H., Samuelsen, A. B., & Malterud, K. E., 2004. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chemistry*, 88(2), 293-297.

Wong, P. Y., & Kitts, D. D., 2006. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, 97(3), 505-515.

Yeganegi, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Asili, J., Alizadeh Behbahani, B., & Beigbabaei, A., 2018. Equisetum telmateia extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial Pathogenesis*, 116, 62-67.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 2, June. July. 2020, p. 221- 233

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۶، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۹ ص. ۲۳۳-۲۲۱

Determination of chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of coriander seed essential oil on a number of pathogenic microorganisms

M. Omidi Mirzaei[1], M. Hojjati[2*], B. Alizadeh Behbahani[3], M. Noshad[3]

Received: 2019.07.18
Accepted: 2019.08.13

Introduction: Essential oils and secondary metabolites of plants have too many uses in medicine as well as food and hygiene industries. The herbal essential oils include different health features including antioxidant and antibacterial activities. Several forms of the activated oxygen, also known as reactive oxygen species (ROS), include free radicals and non-free radical species. In traditional Iranian medicine, coriander seeds are widely used to treat the disease. The objectives of this paper were to identify the chemical compounds and to measure the phenol content and the antioxidant potential of coriander seed essential oil in addition to its free radical scavenging activity. The other aim of this work was to investigate the antimicrobial of coriander seed essential oil on *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* "*in vitro*".

Materials and methods: In this research, the coriander seed essential oil (100 g) was extraction using water-distillation method with clevenger apparatus. Afterwards, coriander seed essential oil was collected in vials which had already been weighed by a 0.0001 balance and stored at 4 °C until testing. Chemical composition of coriander seed essential oil was determined using gas chromatography. The antioxidant activity was determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) di-ammonium salt (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicles, respectively. The method of Folin-Ciocalteu was performed through determination of TPC. The result was reported as mg of gallic acid/g of the dried coriander seed essential oil. The antioxidant potential of the essential oil was compared with BHA synthetic antioxidant at a concentration of 100 μg/ml. Antibacterial activity of coriander essential oil was determined by disc diffusion agar (Kirby-Bauer test), minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) methods.

Results and discussion: Based on the results of chemical analysis, the coriander seed essential oil was rich in oxygenated monoterpenes (89.94%). The main compound of coriander seed essential oil was Linalool (76.75%). The highest percentage of free radical scavenging for DPPH was 53.5% and for ABTS 66.6% at 900 ppm concentration. The total phenol content essential oil was 38.04 ± 0.02 mg GAE/g. The result show that, the most sensitive and the most resistant bacteria with diameter inhibition zone 30.30 mm and 23.15 mm were *Bacillus cereus* and *Salmonella typhi* respectively. MIC of coriander seed essential oil for *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was 2, 4, 4 and 4 mg/ml respectively. MBC of coriander seed essential oil for *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was 512, > 512, > 512 and 512 mg/ml respectively. In general, the results indicated that the coriander seed essential oil was effective on microorganisms; nevertheless, the extent of its effectiveness varied depending on the type of microorganism. The gram-positive bacteria are more sensitive to essential oil rather than gram-negative ones. The higher resistance of gram-negative bacteria to the essential oils of medicinal plants could be attributed to the more complex structure of the cell membrane of these bacteria compared with the single layer structure of the gram-positive ones. The results of this study revealed that coriander seed essential oil had less antioxidant activity than synthetic antioxidant BHA. Antibacterial activity of the essential oil was higher than the gentamicin antibiotic. Regarding the chemical compositions identified in the coriander seed essential oil, these compositions could be employed as an important economical source uses in medicine as we as food and hygiene industries.

Keywords: Antibacterial activity, Coriander seed, Gentamicin antibiotic, Synthetic antioxidant.

1, 2 and 3. MSc Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
(*Corresponding author's email: hojjati@asnrukh.ac.ir)